

Izabela Czapska-Pietrzak, Elżbieta Studzińska-Sroka, \*Wiesława Bylka

## Ocena działania przeciwcukrzycowego ekstraktów otrzymanych z wybranych surowców roślinnych

### Evaluation of antidiabetic activity of extract obtained from selected plant materials

Katedra i Zakład Farmakognozji, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu  
Kierownik Katedry i Zakładu Farmakognozji: dr hab. n. farm. Judyta Cielecka-Piontek

#### SUMMARY

**Introduction.** Diabetes is characterized by chronic hyperglycaemia, resulting from a defect in insulin secretion or abnormal functioning of this hormone. The consequence of the lack of insulin is the disturbed metabolism of carbohydrates, proteins and fats. Chronic hyperglycemia causes damage and dysfunction of many organs. One of the ways to support the treatment of diabetes is the use of plant preparations.

**Aim.** The aim of the study was to examine and compare the biological ( $\alpha$ -glucosidase and antioxidative) activity and the content of polyphenols and flavonoids in selected plants: *Anserinae herba*, *Alchemillae herba* and *Fragariae folium*, included in herbal tea blends used in diabetes.

**Material and methods.** The content of polyphenols was determined by applying the Folin-Ciocalteu reagent and the flavonoid content by the  $AlCl_3$  method. The antioxidant properties were tested using the reagent method DPPH and CUPRAC, while the inhibitory activity of  $\alpha$ -glucosidase by measuring the absorbance of p-nitrophenol from PNPG released by hydrolysis of sugars by the enzyme.

**Results.** High total polyphenols content in the tested plant extracts was found, amounting to 121.30; 98.30; 71.66 mg gallic acid equivalent/g for *Alchemillae herba*, *Fragariae folium* and *Anserinae herba*, respectively, and high flavonoid content (17.56, 12.25, 15.48 mg quercetin equivalent/g, respectively). Antioxidant activity for extracts with a concentration of 0.312 mg/ml was from 46.22 to 79.71% (in the analysis with DPPH radical), while the absorbance value of these tests determined by the CUPRAC method was  $A = 0.49-1.01$ . The effect was weaker than vitamin C. The results indicated a strong inhibitory ability of  $\alpha$ -glucosidase, which was > 98% for all tested extracts at the concentration of 0.1 mg/ml, and was many times higher than the standard acarbose analyzed at the above concentration, and comparable with the acarbose activity at a concentration of 10 mg/ml.

**Conclusions.** The inhibitory  $\alpha$ -glucosidase and antioxidant activity indicates the existence of this mechanism included in analyzed plant extracts, as ingredients herbal tea blends of used in diabetes.

**Keywords:** *Anserinae herba*, *Alchemillae herba*, *Fragariae folium*, polyphenol content antioxidant activity, inhibition of  $\alpha$ -glucosidase, antidiabetic activity

#### STRESZCZENIE

**Wstęp.** Cukrzyca charakteryzuje się przewlekłą hiperglikemią, wynikającą z braku wydzielania insuliny lub nieprawidłowego działania tego hormonu. W konsekwencji dochodzi do zaburzeń metabolizmu węglowodanów, białek oraz tłuszczów. Przewlekła hiperglikemia powoduje uszkodzenie i nieprawidłowe funkcjonowanie wielu narządów. Jednym ze sposobów wspomagania leczenia cukrzycy jest stosowanie surowców i preparatów roślinnych.

**Cel pracy.** Celem pracy było przebadanie i porównanie aktywności biologicznej (hamującej  $\alpha$ -glukozydazę i przeciwutleniającej) oraz zawartości polifenoli i flawonoidów w trzech surowcach roślinnych wchodzących w skład mieszanek stosowanych w cukrzycy.

**Materiał i metody.** Z ziela pięciornika gęsięgo (*Anserinae herba*), ziela przywrotnika (*Alchemillae herba*) i liści poziomki (*Fragariae folium*) przygotowano ekstrakty, w których oznaczono zawartość polifenoli przy użyciu odczynnika Folina-Ciocalteu'a oraz zawartość flawonoidów metodą z  $AlCl_3$ . Właściwości przeciwutleniające badano metodami DPPH oraz CUPRAC, natomiast zdolność hamowania  $\alpha$ -glukozydazy na drodze pomiaru absorbancji p-nitrofenolu powstałego z PNPG wskutek hydrolizy cukrów przez enzym.

**Wyniki.** Wykazano wysoką zawartość sumy polifenoli w badanych surowcach, wynoszącą 121,30; 98,30 i 71,66 mg równoważnika kwasu galusowego/g odpowiednio w przypadku ziela przywrotnika, ziela poziomki i ziela pięciornika gęsiego oraz odpowiednio wysoką zawartość flawonoidów (17,56; 12,25 i 15,48 mg równoważnika kwercetyny/g). Aktywność przeciwutleniająca dla wyciągów o stężeniu 0,312 mg/ml wynosiła od 46,22 do 79,71% (w analizie z rodnikiem DPPH), natomiast wartość absorbancji tych prób oznaczona metodą CUPRAC wynosiła  $A = 0,49-1,01$ . Działanie było słabsze od witaminy C. Analiza wyników wskazywała na silną zdolność hamowania  $\alpha$ -glukozydazy, która wynosiła  $> 98\%$  dla wszystkich badanych ekstraktów w stężeniu 0,1 mg/ml i była wielokrotnie wyższa niż wzorcowej akarbozy analizowanej w powyższym stężeniu, a porównywalna z aktywnością akarbozy w stężeniu 10 mg/ml.

**Wnioski.** Aktywność przeciwutleniająca ekstraktów z *Anserinae herba*, *Alchemillae herba* i *Fragariae folium* była skorelowana z zawartością polifenoli oraz z właściwościami hamowania  $\alpha$ -glukozydazy i wskazuje na ich działanie przeciwcukrzycowe.

**Słowa kluczowe:** ziele pięciornika, ziele przywrotnika, liście poziomki, zawartość polifenoli, aktywność przeciwutleniająca, hamowanie aktywności  $\alpha$ -glukozydazy

## Wprowadzenie

Wiek XX przyniósł gwałtowny wzrost częstości zachorowań na cukrzycę, szczególnie w środowiskach miejskich, zarówno w krajach wysoko, jak i średnio rozwiniętych. Cukrzyca została wpisana na listę chorób społecznych i cywilizacyjnych (1). Według WHO do 2008 roku na świecie było 260 mln ludzi chorych na cukrzycę, a prognozy przewidują, że do 2025 roku ta choroba może dotknąć nawet przeszło 380 mln osób (2).

Cukrzyca należy do przewlekłych chorób metabolicznych o zróżnicowanej etiologii, charakteryzującą się hiperglikemią wynikającą z upośledzenia wydzielania insuliny, nieprawidłowego działania tego hormonu bądź występowania obu tych zaburzeń jednocześnie. Konsekwencją braku insuliny jest nieprawidłowy metabolizm węglowodanów, białek oraz tłuszczów. Przewlekła hiperglikemia powoduje zaburzenie czynności i uszkodzenie wielu narządów. Niebezpieczne są powikłania powstające w wyniku trwania cukrzycy, zarówno ostre, takie jak: kwasica ketonowa, osmotyczna, mleczanowa, których następstwem może być śpiączka cukrzycowa, a także powikłania przewlekłe: mikroangiopatie cukrzycowe (retinopatia, nefropatia, neuropatia), makroangiopatie cukrzycowe w obrębie naczyń wieńcowych, mózgowych, obwodowych oraz zespół stopy cukrzycowej jako następstwo postępującej cukrzycy (3).

Postępowanie terapeutyczne, w szerokim rozumieniu, obejmuje: leczenie nefarmakologiczne, tzn. zmianę stylu życia, właściwą dietę oraz wysiłek fizyczny; leczenie farmakologiczne: podawanie leków (insulina, doustne leki hipoglikemizujące), a także leczenie chorób często towarzyszących cukrzycy (nadciśnienia, hiperlipidemii, otyłości) oraz zapobieganie powikłaniom choroby. W leczeniu cukrzycy bardzo ważne są edukacja prozdrowotna oraz wsparcie psychiczne pacjentów (1-3).

Jednym ze sposobów wspomagania terapii chorych z przewlekłym, podwyższonym poziomem cukru we krwi, cierpiących na cukrzycę typu 2 leczonych syntetycznymi lekami przeciwcukrzycowymi jest stosowanie pojedynczych surowców roślinnych oraz mieszanek ziołowych (4-7). Jednocześnie rosnące zainteresowanie fitoterapią we wspomaganiu leczenia cukrzycy stwarza problem udowodnienia skuteczności stosowanych roślin, a dla pacjentów właściwego wyboru preparatu roślinnego.

W bieżącej pracy zainteresowano się trzema składnikami mieszanek przeciwcukrzycowych.

Ziele pięciornika gęsiego (*Potentilla anserina* L., *Rosaceae*; synonim: ziele srebrnika) jest wykorzystywane w łagodzeniu bolesnego miesiączkowania oraz objawów PMS, w leczeniu biegunki, pomocniczo w cukrzycy, a także miejscowo w stanach zapalnych błony śluzowej jamy ustnej i gardła, w źle gojących się ranach. Związkami czynnymi są garbniki (5-10%), głównie elagotaniny, kwas chlorogenowy i elagowy, glikozydy kemferolu, kwercetyny, myrycetyny, izoramnetyny, 3-O-rutynozyd akacetyny oraz genisteina.

Garbniki uzasadniają stosowanie surowca w biegunkach i w miejscowych stanach zapalnych. Wskazanie ginekologiczne dla *P. anserina* opiera się na badaniach farmakologicznych, dowodzących zdolności zwiększania tonusu izolowanej macicy różnych gatunków zwierząt, a obecność izoflawonu genisteiny, związku o aktywności estrogennej, może wyjaśniać stosowanie ekstraktu w leczeniu PMS (9-13). Z zebranych informacji wynika, że jak dotąd nie prowadzono badań, które potwierdziłyby przeciwcukrzycową aktywność omawianej rośliny.

Ziele przywrotnika pospolitego (*Alchemilla vulgaris* L., *Rosaceae*) w medycynie ludowej stosowane jest wewnętrznie w łagodzeniu dolegliwości menopauzalnych i menstruacyjnych, zaburzeń żołądkowo-jelitowych, a zewnętrznie w stanach zapalnych jamy ustnej, gardła oraz w leczeniu wrzodów, egzem i wysypek (14). Ziele

zawiera garbniki (zwykle 5-8%, niekiedy do 13%), głównie elagotaniny, w największej ilości występują agrimonina, pedunculagina oraz galotaniny, a także obecne są flawonoidy pochodne kwercetyny (3-glukuronid, 3-glukozyd, 3-rutynozyd i 3-arabinozyd kwercetyny), ponadto kwasy fenolowe (galusowy, chlorogenowy, elagowy) (14, 15).

Dotychczasowe badania ekstraktu etanolowego z ziele przywrotnika dowodzą działania przeciwdrobnoustrojowego, przeciwgrzybiczego, przeciwwirusowego oraz silnej aktywności przeciwzapalnej (hamowanie 15-LOX) (16). Udowodniono, że przywrotnik powoduje obniżanie napięcia naczyń krwionośnych (badanie na izolowanych szczurzych tętnicach krezkowych) (17), a ekstrakt metanolowy po podaniu dożołądkowym szczurom wywoływał statystycznie istotne obniżenie ciśnienia tętniczego krwi (18). Ekstrakt wykazywał też silnie antyoksydacyjne działanie w teście z DPPH ( $IC_{50} = 0,09$  mg/ml), cechowała go wysoka zdolność wychwytu rodników nadtlenkowych ( $IC_{50} = 0,95$  mg/ml) oraz zdolność wychwytu rodników hydroksylowych ( $IC_{50} = 0,18$  mg/ml; kolejno), lecz słabsza niż wzorcowej kwercetyny w badanych testach ( $IC_{50} = 0,012$  mg/ml;  $IC_{50} = 0,15$  mg/ml;  $IC_{50} = 0,034$  mg/ml, odpowiednio) (16). Aktywność przeciwutleniająca została również stwierdzona metodą z użyciem kationorodnika ABTS<sup>+</sup> ( $4,79 \pm 0,14$  mmol TEAC), a całkowita zawartość polifenoli wynosiła  $946,59 \pm 2,26$   $\mu$ mol QE (19). Ekstrakt odznaczał się wysoką zdolnością chelatowania jonów żelaza (III), a także wywierał ochronny wpływ wobec bakteryjnego, plazmidowego DNA, narażonego na uszkodzenia pod wpływem rodników hydroksylowych (20).

Ziele przywrotnika było badane pod kątem właściwości przeciwcukrzycowych. Eksperyment prowadzono na myszach z cukrzycą wywołaną za pomocą streptozotocyny, które karmiono przez 12 dni paszą z dodatkiem 6,25% zhomogenizowanego ziele. W badanym modelu okazało się, że przywrotnik nie wywierał wpływu na hiperfagię, polidypsję, hiperglikemię, hipoinsulinemię ani na utratę masy ciała myszy (14, 21).

Liść poziomki (*Fragaria vesca* L., *Fragaria moschata* West., *Fragaria viridis* West., *Fragaria x ananassa* West.) najczęściej jest stosowany jako środek moczopędny oraz w leczeniu łagodnej biegunki (22). Liście zawierają około 5-11% skondensowanych pochodnych katechiny: procyanidyny B1, B2 i B5 (w ilości 124,0 mg/100 g) oraz szereg monomerycznych oraz oligomerycznych elagotanin (głównie agrimonina, pedunculagina, kwas agrimonowy A/B, sanguiny), a całkowita zawartość elagotanin w wyciągu wodno-etanolowym wynosi 51-89 mg/g (23, 24). Ponadto

obecne są flawonoidy (kwercetyna, rutyna, glukozydy luteoliny, genisteina, daidzeina) (25, 26), kwasy organiczne, kwasy fenolowe (salicylowy, cynamonowy, kawowy, chlorogenowy, *p*-kumarowy), resweratrol oraz śladowe ilości olejku eterycznego i związki mineralne (22).

Badania farmakologiczne *in vitro* i *ex vivo* potwierdziły aktywność przeciwzapalną (hamowanie aktywności oksydazy ksantynowej, wpływ na iNOS, ekspresję COX-2, wytwarzanie prostaglandyn) (27, 28), antykoagulacyjną (29, 30), wazodilacyjną i nasercową (31), cytotoksyczną (23) oraz przeciwdrobnoustrojową (32, 33). Aktywność przeciwutleniającą ekstraktu wodnego z liści *F. vesca* oceniano, oznaczając zdolność redukcji żelaza (FRAP), absorpcji rodników tlenowych (ORAC) i wychwytywania wolnych przy zastosowaniu stabilnego rodnika DPPH. Oznaczona zawartość polifenoli (TPC) z odczynnikiem Folina-Ciocalteu'a wynosiła  $62,4 \pm 1,0$  mg kwasu galusowego 1 g suchej masy (34). Właściwości przeciwcukrzycowe liścia poziomki nie były dotąd przedmiotem badań.

## Cel pracy

Celem pracy była ocena aktywności hamującej  $\alpha$ -glukozydazę przez ekstrakty otrzymane z ziele przywrotnika, ziele pięciornika gęsiego oraz liści poziomki jako składników mieszanek ziołowych stosowanych tradycyjnie w cukrzycy. Ocenie poddano także działanie przeciwutleniające oraz całkowitą zawartość polifenoli i sumy flawonoidów w badanych ekstraktach.

## Materiał i metody

### Odczynniki

Odczynnik Folina-Ciocalteu'a, neokuproina, 4-nitrofenyl  $\alpha$ -D-glukopiranoza (PNPG),  $\alpha$ -glukozydaza, 2,2'-difenylo-1-pikrylohydrazyl (DPPH) (Sigma-Aldrich); miedzi (II) chlorek, 2. hydrat cz.d.a., chlorek glinu cz.d.a., węgiel sodu bezwodny, octan amonu cz.d.a., metanol cz.d.a., etanol 96% cz.d.a., diwodorofosforan sodu 2. hydrat cz.d.a., wodorofosforan di-sodu 12. hydrat cz.d.a. (Avantor). Substancje wzorcowe: kwas galusowy, akarboza, witamina C (Sigma-Aldrich) oraz kwercetyna (Roth).

### Materiał do badań

Do badań użyto surowców handlowych: *Anserinae herba* (ziele pięciornika gęsiego), *Alchemillae herba* (ziele przywrotnika), *Fragariae folium* (liść poziomki), zakupionych w Zakładzie Konfekcjonowania Ziół FLOS.

### **Badania fitochemiczne**

#### **Przygotowanie ekstraktów do badań**

Z każdego surowca sporządzono wyciąg: 4 g surowca zalewano 400 ml wody destylowanej o temperaturze pokojowej, mieszaninę doprowadzono do wrzenia na łaźni wodnej, następnie ogrzewano przez 5 min. Po zakończeniu ogrzewania zawartość przykrywano szalką Petriego i po 15 min precedzano przez watę. Otrzymany ekstrakt przenoszono do kolby okrągłodennej i zagęszczono w wyparce próżniowej w temperaturze 40°C do objętości 25 ml. Próbkę do badań zawierały 160 mg surowca w 1 ml.

#### **Oznaczenie zawartości sumy polifenoli**

Całkowitą zawartość sumy polifenoli oznaczono metodą kolorymetryczną z użyciem odczynnika Folina-Ciocalteu'a po wprowadzeniu odpowiednich modyfikacji (35). W wyniku reakcji odczynnika ze związkami o strukturze fenoli w środowisku alkalicznym (pH 10) następuje redukcja jonów molibdenu (VI) do molibdenu (V), co prowadzi do powstania kompleksu o niebieskim zabarwieniu (36).

Do probówek typu Eppendorfa o pojemności 2 ml wprowadzono kolejno: 0,02 ml badanego ekstraktu, 1,48 ml wody, następnie po 0,1 ml odczynnika Folina-Ciocalteu'a, a po minucie 0,4 ml 20% węgla sodu. Próbę ślepa sporządzono, zastępując roztwór badanego wyciągu wodą. Po upływie 30 min od dodania węgla sodu (inkubacja w temperaturze pokojowej) mierzono absorbancję poszczególnych prób przy długości fali  $\lambda = 760$  nm. Oznaczenia wykonano w dwóch powtórzeniach, a wynik jest średnią z 6 pomiarów ( $n = 6$ ). Obliczenia zawartości polifenoli wykonano na podstawie krzywej kalibracyjnej ( $y = 9,8399x + 0,0289$ ;  $r^2 = 0,9993$ ) sporządzonej dla kwasu galusowego (0,2-0,8 mg/ml).

#### **Oznaczenie całkowitej zawartości flawonoidów**

W celu oznaczenia całkowitej zawartości flawonoidów wykorzystano 2% metanolowy roztwór chlorku glinu (III), z którym flawonoidy tworzą związki kompleksowe o żółtym zabarwieniu. Im wyższa zawartość flawonoidów w badanej próbce, tym silniejsze natężenie barwy. Pomiar absorbancji przeprowadzono przy długości fali  $\lambda = 415$  nm. Analizę wykonywano, stosując zmodyfikowaną procedurę opisaną przez Meda i wsp. (37). Do studzienek płytki 96-dołkowej odmierzano 100  $\mu$ l ekstraktu o odpowiednim stężeniu, a następnie dodawano 100  $\mu$ l 2% metanolowego roztworu chlorku glinu (III). Tło stanowiła mieszanina 100  $\mu$ l odpowiedniego ekstraktu i 100  $\mu$ l metanolu. Płytkę owijano folią aluminiową, wytrząsano 2 min

i inkubowano 10 min w temperaturze pokojowej. Absorbancję zmierzono przy długości fali  $\lambda = 415$  nm. Oznaczenia wykonano w dwóch powtórzeniach, a wynik jest średnią z 6 pomiarów ( $n = 6$ ). Zawartość flawonoidów wyznaczono na podstawie krzywej wzorcowej sporządzonej dla kwercetyny (0,05-0,003 mg/ml) ( $y = 93,229x + 0,0116$ ;  $r^2 = 0,9996$ ).

#### **Badania aktywności biologicznej ekstraktów**

##### **Oznaczenie aktywności przeciwutleniającej metodą DPPH**

Zastosowana metoda opiera się na reakcji stabilnego rodnika DPPH<sup>\*</sup> z substancją o właściwościach przeciwutleniających, od której rodnik wychwytuje elektrony. Podczas reakcji następuje zmiana zabarwienia rodnika DPPH<sup>\*</sup> z purpurowego na jasnożółty. Spadek intensywności zabarwienia, proporcjonalny do zawartości substancji przeciwutleniających, rejestrowany jest spektrofotometrycznie przy  $\lambda = 517$  nm (38).

W celu wykonania analizy do studzienek 96-dołkowej płytki nanoszono 20  $\mu$ l danego ekstraktu o stężeniu 0,312 mg/ml oraz 180  $\mu$ l roztworu DPPH (0,1 mM roztwór metanolowy). Próbę ślepa stanowiło 20  $\mu$ l wody destylowanej i 180  $\mu$ l metanolu. Próba kontrolną była natomiast mieszanina 20  $\mu$ l wody i 180  $\mu$ l DPPH. Płytkę owijano folią aluminiową i inkubowano w ciemnym miejscu przez 30 min, przed pomiarem wytrząsano przez 5 min. Absorbancję mierzono przy długości fali  $\lambda = 517$  nm. Oznaczenia wykonywano w dwóch powtórzeniach, a wynik jest średnią z 6 pomiarów ( $n = 6$ ). Substancję wzorcową stanowiła witamina C badana w stężeniu 31,2  $\mu$ g/ml. Zdolność redukcji rodnika DPPH (aktywność antyoksydacyjna, AA%) przez badane ekstrakty obliczano według wzoru:  $AA\% = [(A_{DPPH} - A_{\text{próbki}}) / A_{DPPH}] \times 100\%$ ; gdzie:  $A_{\text{próbki}}$  – absorbancja badanej próbki,  $A_{DPPH}$  – absorbancja próby kontrolnej.

Wyciągi przebadano w stężeniu 0,312 mg/ml, a ich aktywność wyrażono w %.

##### **Oznaczenie aktywności przeciwutleniającej metodą CUPRAC**

Metoda CUPRAC polega na reakcji kompleksu neokuproiny i chlorku miedzi (II) ze związkiem o właściwościach przeciwutleniających, podczas której grupy fenolowe polifenoli utleniają się do chinonów, a kompleks neokuproiny i jonów miedzi (II) o zabarwieniu niebieskim ulega redukcji do kompleksu neokuproiny i jonów miedzi (I) o żółtej barwie. Pomiar absorbancji odbywa się przy długości fali  $\lambda = 450$  nm (39). Ze wzrostem stężenia substancji

przeciwuutleniających w próbce następuje wzrost intensywności zabarwienia.

Analizę aktywności przeciwutleniającej przeprowadzono zgodnie z metodyką opisaną przez Kikowską i wsp. (40). W celu wykonania oznaczenia przygotowano mieszaninę CUPRAC zawierającą równe objętości: buforu octanowego (pH = 7,0), 7,5 mM roztworu neokuproiny w 96% etanolu i 10 mM wodnego roztworu  $\text{CuCl}_2$ . Do studzienek płytki 96-dołkowej dodano 50  $\mu\text{l}$  wzorca lub badanych ekstraktów o stężeniu 0,312 mg/ml, a następnie 150  $\mu\text{l}$  mieszaniny CUPRAC. Tło stanowiła mieszanina 50  $\mu\text{l}$  wody destylowanej oraz 150  $\mu\text{l}$  mieszaniny CUPRAC. Płytkę przez 30 min inkubowano w ciemnym miejscu. Doświadczenie prowadzono w temperaturze pokojowej. Absorbancję mierzono przy długości fali  $\lambda = 450 \text{ nm}$ . Oznaczenie wykonywano w dwóch powtórzeniach, a wynik stanowi wartość średnią z 6 pomiarów ( $n = 6$ ). Jako wzorzec stosowano witaminę C w stężeniu 31,2  $\mu\text{g/ml}$ . Rezultaty przedstawiono jako wartość absorbancji próbki o stężeniu 0,312 mg/ml.

#### Oznaczenie zdolności hamowania $\alpha$ -glukozydazy

Zdolność hamowania  $\alpha$ -glukozydazy przez badane mieszanki ziołowe oceniono, wykorzystując metodę opisaną przez Chipiti i wsp. (41) z własną modyfikacją. Badanie opiera się na pomiarze absorbancji próby, w której pod wpływem działania enzymu  $\alpha$ -glukozydazy z PNPG (4-nitrofenylo- $\alpha$ -glukopiranozy) w środowisku zasadowym uwalnia się glukoza oraz p-nitrofenol (PNG) o żółtym zabarwieniu, wykazujący maksimum absorpcji przy długości fali  $\lambda = 405 \text{ nm}$ . Im silniejszą zdolność hamowania enzymu wykazuje badana substancja, tym mniej p-nitrofenolu uwolni się z PNPG w wyniku hydrolizy przez  $\alpha$ -glukozydazę. Do analizy wytypowano badane ekstrakty oraz wzorcową akarbozę w stężeniach 0,01 i 0,1 mg/ml, dodatkowo akarbozę analizowano w stężeniach 10 i 1 mg/ml. W celu wykonania oznaczenia do studzienek płytki 96-dołkowej odmierzano kolejno: 50  $\mu\text{l}$  0,1 M buforu fosforanowego o pH = 6,8, następnie 50  $\mu\text{l}$  badanego ekstraktu lub substancji wzorcowej w odpowiednich stężeniach oraz 30  $\mu\text{l}$  roztworu  $\alpha$ -glukozydazy o stężeniu 1 U/ml. Tło dla próby badanej stanowiło 80  $\mu\text{l}$  buforu fosforanowego oraz 50  $\mu\text{l}$  roztworu badanego. Kontrola zawierała 50  $\mu\text{l}$  buforu fosforanowego, 50  $\mu\text{l}$  wody destylowanej i 30  $\mu\text{l}$   $\alpha$ -glukozydazy, natomiast tło dla kontroli stanowiło 80  $\mu\text{l}$  buforu fosforanowego oraz 50  $\mu\text{l}$  wody destylowanej. Płytkę inkubowano w temperaturze 37°C przez 15 min, do każdej studzienki dodawano 20  $\mu\text{l}$  PNPG, a następnie inkubowano przez 20 min w temperaturze 37°C. Po tym czasie dodawano 100  $\mu\text{l}$

węglanu (IV) sodu i zmierzono absorbancję przy długości fali  $\lambda = 405 \text{ nm}$ . Wyniki obliczano według wzoru:  $[(A_{\text{PK}} - A_{\text{PB}})/(A_{\text{PK}})] \times 100\%$ ; gdzie:  $A_{\text{PK}}$  – absorbancja próby kontrolnej – absorbancja tła próbki,  $A_{\text{PB}}$  – absorbancja próby badanej. Oznaczenia wykonano w dwóch powtórzeniach, a wynik jest średnią z 6 pomiarów ( $n = 6$ ). Wyniki przedstawiano jako procent hamowania aktywności  $\alpha$ -glukozydazy.

## Wyniki i dyskusja

Rośliny lecznicze są coraz częściej wybieraną przez pacjentów formą wspomagania terapii różnych problemów zdrowotnych. Zasadność ich stosowania w celach terapeutycznych wynika zwykle z wieloletniej tradycji i obserwacji ich skuteczności. Często w przypadku ziół wykorzystywanych w medycynie tradycyjnej jako obniżające poziom cukru we krwi brakuje naukowych danych potwierdzających ich korzystne działanie przeciwcukrzycowe. W pracy podjęto istotne zagadnienie, dotyczące oceny aktywności biologicznej ziela przywrotnika, ziela pięciornika i ziela poziomki, w kontekście obniżania poziomu cukru we krwi, a także w zmniejszaniu powikłań cukrzycy. Oznaczono również całkowitą zawartość związków polifenolowych i flawonoidów, które należą do związków mających istotny wpływ na farmakologiczną aktywność surowców roślinnych.

#### Zawartość polifenoli i flawonoidów

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują na wysoką zawartość sumy polifenoli w badanych surowcach, która wynosi 121,30; 98,30 i 71,66 mg/g w przypadku ziela przywrotnika, ziela poziomki i ziela pięciornika gęsiego. Podobnie, wysoka okazała się zawartość flawonoidów (17,56; 12,25 i 15,48 mg/g) (tab. 1).

Wysoką zawartość sumy polifenoli i flawonoidów można uzasadnić obecnością w badanych roślinach licznych związków fenolowych, np. flawonoidów, elagotanin, garbników katechinowych, kwasów fenolowych i ich pochodnych (10-15, 22-26).

#### Aktywność przeciwutleniająca

Ważnym kierunkiem wspomagania leczenia cukrzycy jest stosowanie oprócz środków obniżających poziom glukozy, substancji naturalnych o aktywności przeciwutleniającej, np. czystych flawonoidów, fenoli oraz surowców roślinnych wykazujących wspomniane działanie. Substancje te, ze względu na wspomaganie naturalnego systemu przeciwutleniającego organizmu, zmniejszają objawy stresu oksydacyjnego, w wyniku którego może dochodzić do uszkodzeń oksydacyjnych niektórych cząsteczek, w tym lipidów, białek i kwasów nukleinowych.

**Tab. 1.** Zawartość polifenoli (TPC) i flawonoidów (TFC), aktywność przeciwutleniająca i hamująca  $\alpha$ -glukozydazę w ekstraktach z badanych surowców

Surowiec/ wzorzec	Zawartość związków (mg/g surowca)		Aktywność biologiczna					
			Przeciwutleniająca		Hamowanie $\alpha$ -glukozydazy (%)			
	TPC	TFC	DPPH (%)	CUPRAC (A)	0,01 mg/ml	0,1 mg/ml	10 mg/ml	1 mg/ml
<i>Anserinae herba</i>	71,66	15,48	46,22	0,49	21,25	98,14	n.b.	n.b.
<i>Alchemillae herba</i>	121,30	17,56	77,69	1,01	88,31	98,80	n.b.	n.b.
<i>Fragariae folium</i>	98,30	12,25	79,71	0,97	2,75	98,74	n.b.	n.b.
Witamina C	n.b.		34,12	0,28	n.b.			
Akarboza			n.b.		1,76	2,28	87,31	33,33

n.b. – nie badano

U chorych na cukrzycę w wyniku hiperglikemii częściej niż u zdrowych ludzi dochodzi do zwiększenia wytwarzania wolnych rodników oraz do osłabienia endogennego systemu obrony przeciwutleniającej. W konsekwencji nasila się peroksydacja lipidów, uszkodzenie kwasów nukleinowych oraz glikacja białek, co prowadzi do zmian w strukturze błon komórkowych. Stres oksydacyjny zatem istotnie wpływa na rozwój powikłań cukrzycowych, naczyniowych i neurologicznych. Rezultaty prac wielu autorów dowodzą, że aktywność przeciwutleniająca surowców roślinnych jest determinowana przez związki polifenolowe (42).

Otrzymane wyniki badań potwierdziły tę zależność, a mianowicie ekstrakty z ziela pięciornika gęsiego, ziela przywrotnika i liści poziomki cechowały się wysoką zawartością sumy polifenoli i flawonoidów oraz wykazywały silnie działanie przeciwutleniające, na co wskazuje silna aktywność antyoksydacyjna (46,22-79,71%, w analizie z rodnikiem DPPH oraz wysoka wartość absorbancji  $A = 0,49-1,01$  oznaczona metodą CUPRAC) próbek o stężeniu 0,312 mg/ml. Oznaczona aktywność antyoksydacyjna witaminy C w stężeniu 10-krotnie niższym (31,2  $\mu$ g/ml) od badanych próbek wynosiła odpowiednio 34,12% w metodzie DPPH i  $A = 0,28$  oznaczona metodą CUPRAC.

#### Hamowanie $\alpha$ -glukozydazy

Jednym z badań sugerujących skuteczność preparatów o działaniu przeciwcukrzycowym jest ocena zdolności blokowania  $\alpha$ -glukozydazy. Inhibitory  $\alpha$ -glukozydazy obecne w surowcach roślinnych hamują rozkład polisacharydów do cukrów prostych w obrębie jelit, stąd zmniejszone jest wchłanianie glukozy z przewodu pokarmowego (2). Surowce roślinne

o takim potencjale leczniczym, oprócz prawidłowej diety o niskim indeksie glikemicznym, przyczyniają się do zmniejszenia ryzyka powikłań cukrzycy.

Ekstrakty z badanych surowców oraz wzorcową akarbozę badano w stężeniach 0,01 i 0,1 mg/ml, dodatkowo akarbozę w stężeniach 10 i 1 mg/ml. Analiza uzyskanych wyników wskazywała, że wszystkie testowane ekstrakty cechowała wysoka zdolność hamowania  $\alpha$ -glukozydazy, która wynosiła  $> 98\%$  dla ekstraktów w stężeniu 0,1 mg/ml  $> 98\%$ , dla 0,01 mg/ml od 2,75 do 88,31% i była wielokrotnie silniejsza od wzorcowej akarbozy (1,76 i 2,28%, w stężeniach 0,01 i 0,1 mg/ml, odpowiednio), natomiast była porównywalna do aktywności akarbozy w stężeniu 10 mg/ml (tab. 1).

Badana jako wzorzec akarboza jest przykładem stosowanego w farmakoterapii cukrzycy składnika leków syntetycznych o działaniu polegającym na hamowaniu  $\alpha$ -glukozydazy. Pacjentom z cukrzycą typu 2 najczęściej przepisywane są również inne syntetyczne inhibitory  $\alpha$ -glukozydazy, szczególnie w celu zmniejszenia hiperglikemii poposiłkowej. Pomimo dowiedzonego działania leków z tej grupy, obserwowane są rezygnacje pacjentów z inhibitorów  $\alpha$ -glukozydazy. Przyczyną są działania niepożądane ze strony przewodu pokarmowego: biegunki, ból, wzdęcia i inne zaburzenia jelitowe. Surowce roślinne mogą zmniejszać te dolegliwości ze względu na zawartość związków o działaniu rozkurczowym, przeciwzapalnym i ściągającym. Innym aspektem zainteresowania surowcami roślinnymi jest potencjalna możliwość zmniejszenia dawek syntetycznych leków przeciwcukrzycowych.

Możliwość obniżenia dawki akarbozy przy stosowaniu jej łącznie z kwasem galusowym udowodnili Oboh i wsp. (43). Wykazano, że mieszanina obu

związków w stosunku 1:1 hamowała glikozydazę w  $65,7 \pm 1,4\%$ , jedynie w niewielkim stopniu słabiej niż sama akarboza ( $66,2 \pm 0,7\%$ ) i znacznie silniej niż czysty kwas galusowy ( $43,9 \pm 0,7\%$ ). Mieszanina akarbozy i kwasu galusowego także hamowała peroksydację lipidów w homogenacie tkanek trzustki szczura i wykazywała aktywność przeciwutleniającą (metody ABTS, DPPH) oraz zdolność chelatowania jonów żelaza (III). Zgodnie z sugestią autorów, stosowanie akarbozy łącznie kwasem galusowym (1:1) w terapii przeciwcukrzycowej może przyczynić się do zmniejszenia skutków ubocznych akarbozy.

### Podsumowanie

Wyniki naszych badań pozwoliły na ocenę w warunkach *in vitro* potencjału działania przeciwutleniającego i przeciwcukrzycowego wybranych surowców roślinnych, będących składnikami mieszanek stosowanych tradycyjnie w cukrzycy, a których aktywność

w tym kierunku nie była dotąd badana. Wykazaliśmy, że analizowane surowce hamują silnie aktywność  $\alpha$ -glukozydazy oraz mogą pełnić funkcję wspomagającą jako przeciwutleniacze. Znaczenie ma wykazane w innych pracach ich działanie przeciwzapalne uwarunkowane obecnością flawonoidów, antocyjanów, proantocyjanidyn, kwasów fenolowych, elagotanin i innych polifenoli. Badane surowce są składnikami przeciwcukrzycowych mieszanek, które mogą przyczyniać się do zmniejszenia działań niepożądanych leków syntetycznych bądź do obniżenia ich dawki. Skuteczność mieszanek może wynikać też z synergizmu działania między związkami czynnymi (44, 45).

Przedstawione wyniki mogą dostarczyć wskazówek ważnych przy wyborze mieszanki przeciwcukrzycowej. Odpowiedzi na pytanie dotyczące skuteczności ich działania można będzie się spodziewać po przeprowadzeniu badań farmakologicznych i klinicznych oraz ocenie uzyskanych wyników.

### Piśmiennictwo

1. <https://apps.who.int> (data dostępu: 2.2019).
2. Błęcha K, Wawer I. Profilaktyka zdrowotna i fitoterapia. Bonimed, Żywiec 2011; 1:147-52.
3. Czupryniak L, Strojek K. Diabetologia. Via Medica, Gdańsk 2018.
4. Schulz J, Überhuber E. Leki z Bożej apteki. Nowe Spojrzenie, Warszawa 2012.
5. Ożarowski A. Leki roślinne. Informator. Wyd. Zjedn Przem Ziel. Herbapol, Warszawa 1978.
6. Lamer-Zarawska E, Kowal-Gierczak B, Niedworok J. Fitoterapia i leki roślinne. Wyd Lek PZWL, Warszawa 2014.
7. Skarżyński A. Ziola czynią cuda. Agencja Wyd Comes, Warszawa 1994.
8. Strzelecka H, Kowalski J. Encyklopedia zielarstwa i ziołolecznictwa. PWN, Warszawa 2000; 258-9.
9. Gruenwald J, Brendler T, Jaenicke C. PDR for Herbal Medicines. 3<sup>rd</sup> ed. Med Econ Comp, New Jersey 2004.
10. Mari A, Lyon D, Montoro P i wsp. Phytochemical composition of *Potentilla anserina* L. analyzed by an integrative GC-MS and LC-MS metabolomics platform. *Metabolomics* 2013; 9(3):599-607.
11. Zou YN, Kim AR, Kim JE i wsp. Peroxynitrite scavenging activity of sinapic acid (3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid) isolated from *Brassica juncea*. *J Agric Food Chem* 2002; 50:5884-90.
12. Kim, HY, Moon BH, Lee HJ i wsp. Flavonol glycosides from the leaves of *Eucommia ulmoides* O. with glycation inhibitory activity. *J Ethnopharmacol* 2004; 93:227-30.
13. Tomczyk M, Bazyłko A, Staszewska A. Determination of polyphenolics in extracts of *Potentilla* species by high performance thin-layer chromatography photodensitometry method. *Phytochem Anal* 2010; 21:174-9.
14. Miętkiewska K, Łażewska D, Czapska-Pietrzak I i wsp. Przywrotnik pospolity (*Alchemilla vulgaris* L.) – związki czynne, aktywność biologiczna oraz zastosowanie lecznicze. *Post Fitoter* 2018; 19(3):176-82.
15. Bradley P. British Herbal Compendium. Vol. 2. A Handbook of scientific information on widely used plant drugs. Brit Herbal Med Assoc, Bournemouth 2016.
16. Trouillas P, Calliste CA, Allais DP i wsp. Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen water plant extracts used in the Limousin countryside as herbal teas. *Food Chem* 2003; 80:399-407.
17. Takır S, Altun IH, Sezgi B i wsp. Vasorelaxant and blood pressure lowering effects of *Alchemilla vulgaris*: a comparative study of methanol and aqueous extracts. *Pharmacogn Mag* 2015; 11(41):163-8.
18. Takır S, Sezgi B, Süzgeç-Selçuk S i wsp. Endothelium-dependent vasorelaxant effect of *Alchemilla vulgaris* methanol extract: a comparison with the aqueous extract in rat aorta. *Nat Prod Res* 2014; 28:2182-5.
19. Kiselova Y, Ivanova D, Chervenkov T i wsp. Correlation between the *in vitro* antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Bulgarian herbs. *Phytother Res* 2006; 20:961-5.
20. Oktyabrsky O, Vysochina G, Muzyka N i wsp. Assessment of anti-oxidant activity of plant extracts using microbial test systems. *J Appl Microbiol* 2009; 106:1175-83.
21. Swanson-Flatt SK, Day C, Bailey CJ i wsp. Traditional plant treatments for diabetes. Studies in normal and streptozotocin diabetic mice. *Diabetol* 1990; 33:462-4.
22. European Union herbal monograph on *Fragaria vesca* L., *Fragaria moschata* Weston, *Fragaria viridis* Weston and *Fragaria x ananassa* (Weston) Duchesne ex Rozier, folium 20 November 2018 EMA/HMPC/432278/2015.
23. Liberal J, Costa G, Carmo A i wsp. Chemical characterization and cytotoxic potential of an ellagitannin-enriched fraction from *Fragaria vesca* leaves. *Arab J Chem* 2015; 11.
24. Moilanen J, Koskinen JP, Salminen P. Distribution and content of ellagitannins in Finnish plant species. *Phytochem* 2015; 116:188-97.

25. Najda A, Dyduch M. Chemical diversity within strawberry (*Fragaria vesca* L.) species. *Herba Pol* 2009; 55:140-6.
26. Najda A, Dyduch M. Contents and chemical composition of essential oils from wild strawberry (*Fragaria vesca* L.). *Herba Pol* 2009; 55:153-62.
27. Havlik J, Gonzalez de la Huebra R, Hejtmankova K i wsp. Xanthine oxidase inhibitory properties of Czech medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 2010; 132(2):4615-23.
28. Tunón H, Olavsdotter C, Bohlin L. Evaluation of anti-inflammatory activity of some Swedish medicinal plants. Inhibition of prostaglandin biosynthesis and PAF-induced exocytosis. *J Ethnopharmacol* 1995; 48(2):61-76.
29. Pawlaczyk I, Czerchawski L, Pilecki W i wsp. Polyphenolic-polysaccharide compounds from selected carbohydrate polymers. *Carbohydr Polym* 2009; 77:568-775.
30. Pawlaczyk I, Lewik-Tsirigotis M, Capek P i wsp. Effects of extraction condition on structural features and anticoagulant activity of *F. vesca* L. conjugates. *Carbohydr Polym* 2013; 92(1):741-50.
31. Mudnic I, Mudnic D, Brizic I i wsp. Cardiovascular effects *in vitro* of aqueous extract of wild strawberry (*Fragaria vesca* L.) leaves. *Phytomed* 2009; 16(5):462-9.
32. Borah M, Ahmed S, Das S. A comparative study of the antibacterial activity of the ethanolic extracts of *Vitex negundo* L., *Fragaria vesca* L., *Terminalia arjuna* and *Citrus maxima*. *Asian J Pharm Biol Res* 2012; 2(3):183-7.
33. Pereira FA, Santos T, Pereira SG i wsp. Activity of strawberry (*Fragaria vesca*) leaf phenolic extracts on metallo-beta-lactamase VIM-2 producers *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect* 2012; Suppl 18:755-6.
34. Buricova L, Andjelkovic M, Reblova Z i wsp. Antioxidant capacities and antioxidants of strawberry, blackberry and raspberry leaves. *Czech J Food Sci* 2011; 29:181-9.
35. Studzińska-Sroka E, Dudek-Makuch M, Chanaj-Kaczmarek J i wsp. Anti-inflammatory activity and phytochemical profile of *Galinsoga parviflora* Cav. *Molecules* 2018; 23(9):2133.
36. Cybul M, Nowak R. Przegląd metod stosowanych w analizie właściwości antyoksydacyjnych wyciągów roślinnych. *Herba Pol* 2008; 58(1):68-78.
37. Meda A, Lamien C, Romito M i wsp. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Faso honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chem* 2005; 91:571-7.
38. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *SJST* 2004; 26(2):211-9.
39. Apak R, Güçlü K, Özyürek M i wsp. Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. *Microchim Acta* 2008; 160:413-9.
40. Kikowska MA, Chmielewska M, Włodarczyk A i wsp. Effect of pentacyclic triterpenoids-rich callus extract of *Chaenomeles japonica* (Thunb.) Lindl. ex Spach on viability, morphology, and proliferation of normal human skin fibroblasts. *Molecules* 2018; 23(11).
41. Chipiti T, Ibrahim MA, Singh M i wsp. *In vitro*  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory and cytotoxic activities of extracts from *Cissus cornifolia* plant parts. *Pharmacogn Mag* 2017; 13(2):329-33.
42. Soobrattee MA, Bahorun T, Neergheen VS i wsp. Assessment of the content of phenolics and antioxidant actions of the *Rubiaceae*, *Ebenaceae*, *Celastraceae*, *Erythroxylaceae* and *Sterculaceae* families of Mauritian endemic plants. *Toxicol In Vitro* 2008; 22:45-56.
43. Oboh G, Ogunsuyi OB, Ogunbadejo MD i wsp. Influence of gallic acid on  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory properties of acarbose. *J Food Drug Anal* 2016; 24:627-34.
44. Williamson EM. Synergy and other interactions in phyto-medicines. *Phytomed* 2001; 8:401-9.
45. Wichtl M. Herbal drugs and phytopharmaceuticals. A handbook for practice on a scientific basis. *Medpharm Sci Publ*, Stuttgart 2004.

**Konflikt interesów**

**Conflict of interest**

Brak konfliktu interesów

None

otrzymano/received: 06.06.2019

zaakceptowano/accepted: 15.07.2019

Adres/address:

\*prof. dr hab. n. farm. Wiesława Bylka

Katedra i Zakład Farmakognozji

Uniwersytet Medyczny

im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

ul. Święcickiego 4, 60-781 Poznań

e-mail: wieslawabylka@tlen.pl